

УДК 579.83:577.213.3

С.М. Григор'єва, О.В. Мурашко

**ПІДТВЕРДЖЕННЯ РОДОВОЇ НАЛЕЖНОСТІ
БІФІДОБАКТЕРІЙ МЕТОДОМ
ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

*ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб
імені Л.В. Громашевського НАМН України"*

У наш час у медицині для корекції мікробіоценозів кишкових біотопів широко використовуються біопрепарати. Унікальні в цьому напрямку також кисломолочні продукти і біологічно активні добавки (БАД) до їжі [1]. Культури корисних мікроорганізмів, на основі яких створюються пробіотики, БАДи та продукти харчування, чинять позитивний вплив на мікроекологію шлунково-кишкового тракту, імунну систему і на організм людини в цілому [3, 11, 12].

Проте, їх активне використання веде до необхідності детальнішого вивчення пробіотичних штамів із застосуванням сучасних методів дослідження. Ідентифікація бактерій, у тому числі і колекційних штамів, традиційно проводиться на основі морфологічних і біохімічних методів [5], тоді як в міжнародній практиці важлива роль відводиться даним, що відображають особливості структури ДНК мікроорганізмів [4, 7, 8]. Останніми роками різні прийоми молекулярно-генетичного аналізу, виявляючи особливості генотипу бактерій, запобігають фальсифікації культур, тим самим підвищуючи безпеку виробництва і захищаючи права розробника у разі несанкціонованого використання штамів [6]. У нашій роботі представлені результати використання методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням універсальних праймерів для родової ідентифікації біфідобактерій [2].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідях використано 34 "диких" штами біфідобактерій, виділених від здорових людей, та 15 пробіотичних препаратів різних виробників.

Культури біфідобактерій вирощували на напіврідкому середовищі "біфідумсередовище", виробництва Оболенськ (Росія), при температурі

+37°C протягом 24–48–72 годин (залежно від виду) в анаеробоксі із застосуванням анаеробної системи — газових генераторів (BioMerieux, Франція). Отриману культуральну рідину центрифугували при 1000 об./хв протягом 2 хвилин для отримання щільного осаду.

ДНК отримували за допомогою системи для виділення ДНК "Сорб-АМ", виробництва "Амплісенс" Москва (Росія).

Метод ПЛР проводили з використанням універсальних родоспецифічних праймерів: Bif 164-f (5'-GGGTGGTAATGCCGGATG-3') та Bif 662-r (5'-CCACCGTTACACCGGGA-3') [9, 10]. ПЛР проводили у об'ємі реакційної суміші 50 мкл. У пробірку марковану К+ (позитивний контроль) вносили 5 мкл розчину позитивного контролю. У пробірку марковану як К- (негативний контроль) вносили 5 мкл розчину негативного контролю (дистильована вода, оброблена як клінічний зразок). Підвищення чутливості та специфічної реакції забезпечували використанням методики "гарячого старту". Програма ампліфікації: 94°C — 1 хв. 30 сек.; 94°C — 5 сек., 60°C — 5 сек., 94°C — 5 сек. (40 циклів); 72°C — 5 хв. Аналіз отриманих даних проводили методом гель-електрофорезу в 2% агарозному гелі виробництва "Амплісенс" Москва (Росія). Електрофорез проводили при напрузі 3–5 вольт/см протягом 20–30 хвилин (звичайно 75–125 вольт при відстані між електродами в камері для електрофорезу 25 см).

Результати гель-електрофорезу враховували під ультрамикроскопом, ПЛР-фрагменти, що співпадали у позитивному контролі та в обстежуваних зразках свідчили про присутність ДНК бактерій роду *Bifidobacterium*. При відсутності фрагментів, що співпадали з позитивним контролем або присутності смуг, що не відповідали розмірам позитивних контролів в обстежуваних зразках результати вважали негативним. Молекулярну масу визначали за допомогою маркера молекулярної маси.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для всіх 34 штамів, ізольованих від людей, молекулярна маса складала 520 нуклеотидних пар (н.п.), що надало можливість віднести їх до роду *Bifidobacterium* результати родової ідентифі-

кації штамів “диких” біфідобактерій, отриманих молекулярно-генетичним методом ПЛР представлені на (рис. 1, 2, 3).

Під номером 7, 12, 10 відповідно на рис. 1, 2 та 3 — маркер молекулярної маси, що відповідає 500–520 нуклеотидних пар, це співпадає з кількістю нуклеотидних пар у біфідобактерій та підтверджує належність цих штамів до роду *Bifidobacterium*. Також представлені типові результати отриманих продуктів ПЛР стосовно штамів 1–5; 1–11; 1,3–8, що виявилися біфідобактеріями. Штам № 6 на рис. 1 та № 2 на рис. 3 — контрольний штам *Lactobacillus acidophilus*, до роду біфідобактерій згідно молекулярно-генетичних досліджень не відносився.

З метою родової ідентифікації штамів мікроорганізмів, що містяться у препаратах: “Біфідумбактерин” виготовлений у 1999 р., виробництва “Біофарма” Київ; “Біфідумбактерин” виготовлений у 2007 р., виробництва “Біофарма” Київ; “Біфіформ”, фірми “Fergosan”; “Біфідумбактерин”, Одеса; “Біфідумбактерин”, концерн “Імуноген” НПО “Біомед” Перм, Росія; “Біфаціл”, “Термес” Київ; “Кіпацід”, “Біокад” Москва, Росія; “Біфідумбактерин форте”, “Партнер” Москва, Росія; “Біфідумбактерин-мульти”, Інститут ім. Г.Н. Габричевського Москва, Росія; “Біфідумбактерин форте”, Одеса; “Біфідумбактерин”, “Імбіо” Нижній Новгород, Росія; “Пробіфор”, “Партнер” Москва, Росія; “Біфідумбактерин”, “Біолек” Харків, “Біоспорин”, ОАО “Дніпрофарм” та комбінованому трьохкомпонентному комерційному препараті, який містить природну мікрофлору з різних відділів кишечника і який рекомендовано при порушенні рівноваги мікрофлори (дисбактеріозі) було застосовано метод ПЛР з використанням родоспецифічних праймерів (рис. 4).

У результаті ПЛР для 12 біфідовмісних препаратів продукти ампліфікації підтвердили належність штамів, використаних для виробництва препаратів, до роду біфідобактерій. Винятком був комерційний препарат (№ 6) і препарат “Біфаціл” (№ 7). Препарат “Біоспорин” (№ 15) з штамів *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* також показав негативний результат.

Виявлення особливостей генотипу бактерій методом ПЛР дозволяє попередити фальсифікацію культур, що використовуються для виробництва лікарських препаратів, кисломолочних продуктів, біологічно активних добавок до їжі, а також гіпердіагностики біфідобактерій в до-

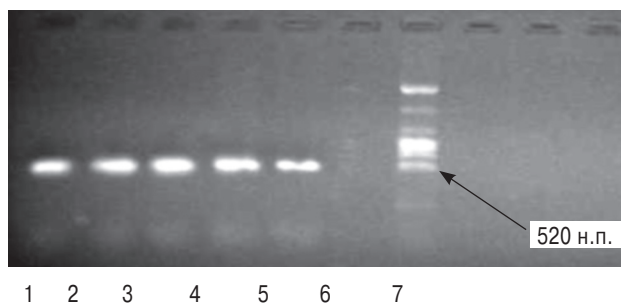


Рис. 1. Продукти ампліфікації, отримані в результаті ПЛР для штамів “диких” біфідобактерій. (7 — маркер, 1–5 — штамів біфідобактерій, ізольовані від людей, 6 — контроль — штам *Lactobacillus acidophilus*)

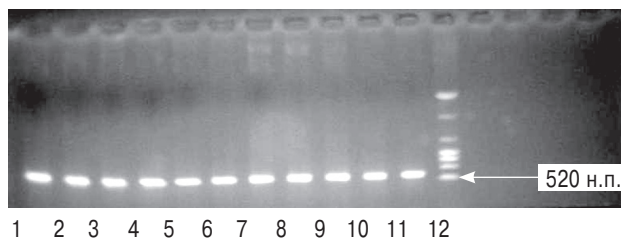


Рис. 2. Продукти ампліфікації, отримані в результаті ПЛР для родової ідентифікації штамів “диких” біфідобактерій. (12 — маркер, 1–11 — штамів біфідобактерій, ізольовані від людей)

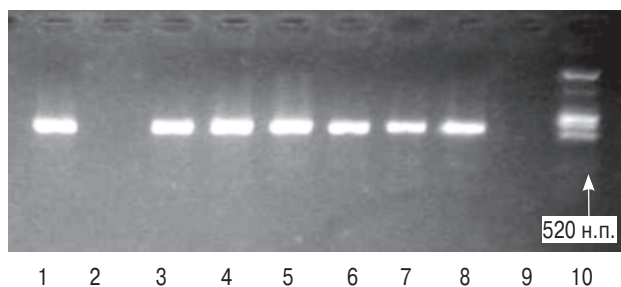


Рис. 3. Результати родової ідентифікації “диких” біфідобактерій методом ПЛР. (10 — маркер; 1, 3–8 — штамів біфідобактерій, ізольовані від людей, 2 — позитивний контроль — *Lactobacillus acidophilus*, 9 — негативний контроль — реакційна суміш без ДНК)

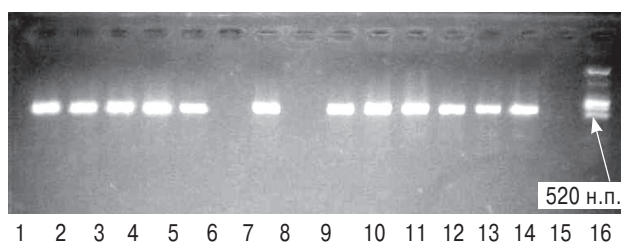


Рис. 4. Продукти ампліфікації, отримані в результаті ПЛР препаратів-пробіотиків із застосуванням родоспецифічних праймерів. (16 — маркер 520 пар нуклеотидів, 15 — контроль — препарат “Біоспорин”, 1–14 — пробіотики з вмістом біфідобактерій)

слідженнях на дисбіоз. Це дозволить в майбутньому за допомогою молекулярно-генетичних методів паспортизувати промислові та музейні штамів *Bifidobacterium*, що використовуються для виготовлення пробіотиків

ЛІТЕРАТУРА

1. Амерханова А.М. Научно-производственная разработка новых препаратов — синбиотиков. Клинико-лабораторная оценка их эффективности: Автореферат диссертации д-ра биол. наук: 03.00.07. НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. — М., 2009. — 47 с.
2. Блохина И.Н. Подходы к классификации бифидобактерий на основе данных о структуре их ДНК / И.Н. Блохина, Г.Р. Леванова, А.Ю. Лихачева // Мол. генетика, микробиол., вирусол. — 1995. — № 4. — С. 27–29.
3. Григорьев А.В. Желудочно-кишечный тракт как среда обитания бактерий. Раздел 1. Морфология желудочно-кишечного бактериального биотопа. Пособие для врачей и научных работников. — Москва: Силма, 2004. — 123 с.
4. Лясковский Т.М. Оценка пробиотиков, согласно рекомендациям международных организаций (FAO/WHO) / Т.М. Лясковский, В.С. Подгорский // Микробиол. журн. — 2005. — Т. 67, № 6. — С. 104–112.
5. Полтавська О.А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел. Автореферат канд. біол. наук: 03.00.07. НАН України. Ін-т мікроб. вірус. ім. Д.К. Заболотного. — Київ, 2006. — 20 с.
6. Чупринина Р.П. Доклиническая оценка безопасности (безвредности) производственных штаммов и лекарственной формы пробиотиков / Р.П. Чупринина, И.Г. Осипова, В.Ф. Евлашкина, А.В. Ладыгина // Вакцинология 2006. Совершенствование иммунологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней: Тезисы Всероссийской научно-практической конференции. — Москва. — 2006. — С. 105.
7. Beigton David. Isolation and identification of Bifidobacteriaceae from human saliva / D. Beigton, S.C. Gilbert, D. Clark [et al.] // Applied and Environmental Microbiology — 2008. — Vol. 74, № 20. — P. 6457–6460.
8. Kaufman P. Identification and quantification of bi-fidobacterium species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR / P. Kaufman, A. Pfefferkorn, M. Teuber [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — Vol. 63. № 4. — P. 1268–1273.
9. Matsuki T. Development of 16S rRNA-gene-targeted group specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces / T. Matsuki, K. Watanabe, J. Fujimoto [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — Vol. 68, № 5. — P. 5445–5451.
10. Matsuki T. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers / T. Matsuki, K. Watanabe, R. Tanaka [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — Vol. 65, № 10. — P. 4506–4512.
11. Satokari Reetta M. Molecular approaches for the Detection and Identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract / R.M. Satokari, E.E. Vaughan, H. Smidt [et al.] // Systematic and applied microbiology. — 2003. — Vol. 26 (4). — P. 572–584.
12. Turroni Francesca Exploring the diversity of the Bifidobacterial population in the human intestinal tract / F. Turroni, E. Foroni, P. Pizzetti [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. — 2009. — Vol. 75, № 6. — P. 1534–1545.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ РОДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БИФИДОБАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

С.М. Григорьева, Е.В. Мурашко

В работе особое внимание уделено возможности идентификации микроорганизмов рода *Bifidobacterium* с

помощью полимеразной цепной реакции. Использование современных методов молекулярно генетического анализа повысит безопасность препаратов-пробиотиков, биологически активных добавок и продуктов питания, обогащенных нормофлорой, а также исключит возможную фальсификацию стартовых культур, тем самым защищая права разработчиков в случае их несанкционированного использования.

CONFIRMATION OF FAMILY BELONGING OF BIFIDOBACTERIA BY METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION

S.M. Grygoryeva, E.V. Murashko

In work the special attention is given possibility of identification of microorganisms of genus *Bifidobacterium* by polymerase chain reaction. Use of modern methods of the molecular-genetic analysis will raise safety of preparations-probiotics, BAS and the foodstuff enriched normal microbiota, and also will exclude possible falsification of starting cultures, thereby protecting the rights of developers in case of their unapproved use.

УДК 616.988: 616-006.52-076/.078:575.191:611-018.1

О.В. Ковалюк, І.В. Дзюблик,
І.Г. Костенко, О.А. Олійник,
Н.М. Жеребко, Г.П. Артемчук

НОВІ АСПЕКТИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПАПІЛОМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України, м. Київ

Рак шийки матки (РШМ) посідає друге місце після раку молочної залози серед злоякісних пухлин репродуктивної системи жінок і являє собою серйозну загрозу життю та здоров'ю жіночого населення. У світі щороку інвазійний РШМ вперше діагностується у майже 500 тисяч жінок, 273 тисяч помирають від цього захворювання, причому 3/4 — в країнах, що розвиваються [4, 9, 10].

В Україні щороку від РШМ помирають понад 2 тис. осіб, з них 700 — жінки репродуктивного віку. Актуальності проблемі додає не лише високий показник захворюваності, але й випадки пізно діагностованого раку та захворювання молодих і неповнолітніх пацієнток. Кожна п'ята жінка в Україні помирає протягом першого року після встановлення діагнозу РШМ. Крім того, в Україні збільшується превалентність інфекцій, що передаються статевим шляхом (ІПСШ), які потенціюють онкогенний вплив вірусу папіло-